

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

cited in the European Search  
Report of EP 04 70 4717.3  
Your Ref.: 1000 P 11527 EPO

PUBLICATION NUMBER : 2002291466  
PUBLICATION DATE : 08-10-02

APPLICATION DATE : 30-03-01  
APPLICATION NUMBER : 2001098734

APPLICANT : ORIENTAL YEAST CO LTD;

INVENTOR : NAKAMURA NATSUKO;

INT.CL. : C12N 1/20 A21D 8/04 A21D 13/00 A23L 3/3571 //(C12N 1/20 , C12R 1:225 )

TITLE : NEW LACTIC ACID BACTERIUM AND FERMENTED FLAVOR SOLUTION  
CONTAINING THE SAME

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide *Lactobacillus sanfranciscensis* capable of producing an antimicrobial substance exhibiting an antifungal property, and to provide a fermented flavor solution which is obtained by fermenting a lactic acid bacterium belonging to the genus *Lactobacillus*, can inhibit or mask irritative acidic smell, acidic taste, and the like without damaging a flavor suitable for foods such as bread, and exhibits antimicrobial properties such as an antifungal property.

SOLUTION: *Lactobacillus sanfranciscensis* producing a non-organic acid antimicrobial substance exhibiting at least an antifungal property. A mode wherein the non-organic acid antimicrobial substance exhibits a yeast proliferation-inhibiting ability or is a heat-resistant substance. A mode wherein the *Lactobacillus sanfranciscensis* has oleic acid auxotrophy, is an acid-producing fungus, and exhibits a maltose-fermenting property. A mode wherein the *Lactobacillus sanfranciscensis* produces lactic acid in an amount of  $\geq 10$  weight times that of acetic acid. A *Lactobacillus* lactic acid bacterium-fermented flavor solution containing the *Lactobacillus* lactic acid bacterium. A mode wherein the fermented flavor solution is added to a food wherein the *Lactobacillus* lactic acid bacterium is preferably added to a raw material to give the live bacterium number of  $\geq 1.0 \times 10^8$  CFU/g in a mixing process for producing breads.

COPYRIGHT: (C)2002,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-291466

(P2002-291466A)

(43) 公開日 平成14年10月8日 (2002.10.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A 4 B 0 2 1
A 2 1 D 8/04		A 2 1 D 8/04	4 B 0 3 2
	13/00		4 B 0 6 5
A 2 3 L 3/3571		A 2 3 L 3/3571	
// (C 1 2 N 1/20		C 1 2 R 1:225	

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-98734(P2001-98734)

(22) 出願日 平成13年3月30日 (2001.3.30)

(71) 出願人 000103840

オリエンタル酵母工業株式会社

東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号

(72) 発明者 安藤 正康

東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号 オリ

エンタル酵母工業株式会社内

(72) 発明者 篠宮 好明

東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号 オリ

エンタル酵母工業株式会社内

(74) 代理人 10010/515

弁理士 廣田 浩一 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な乳酸菌及びそれを含む発酵風味液

(57) 【要約】

【課題】 防黴性を示す抗菌性物質を産生可能なラクトバチルス・サンフランシスエンシス、及び、パン等の食品に好適で風味を害さず刺激的な酸臭・酸味等を抑制乃至マスク可能な、防黴性等の抗菌性を示すラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液の提供。

【解決手段】 防黴性を少なくとも示す非有機酸抗菌性物質を産生するラクトバチルス・サンフランシスエンシス。非有機酸抗菌性物質が酵母の増殖抑制能を示す又は耐熱性物質である態様、オレイン酸栄養要求性があり、酸生成菌でマルトース発酵性を示す態様、酢酸に対する乳酸の産生量が重量比で10倍以上である態様、ラクトバチルス属乳酸菌を含むラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。食品に添加される態様、生菌数が $1.0 \times 10^8$  CFU/g以上にパン製造のミキシング工程で原料に添加される態様が好ましい。

(2) 002-291466 (P2002-291466A)

## 【特許請求の範囲】

【請求項１】 徴の増殖を抑制する抗菌性物質を産生することを特徴とするラクトバチルス・サンフランシスコエンス（*Lactobacillus sanfranciscensis*）。

【請求項２】 抗菌性物質が酵母の増殖を抑制する請求項１に記載のラクトバチルス・サンフランシスコエンス。

【請求項３】 抗菌性物質が耐熱性の非有機酸物質である請求項１又は２に記載のラクトバチルス・サンフランシスコエンス。

【請求項４】 オレイン酸栄養要求性があり、酸生成菌であり、マルトース発酵性を示す請求項１から３のいずれかに記載のラクトバチルス・サンフランシスコエンス。

【請求項５】 ヘテロ発酵型であり、酢酸に対する乳酸の産生量が重量比で１０倍以上である請求項１から４のいずれかに記載のラクトバチルス・サンフランシスコエンス。

【請求項６】 徴の増殖を抑制する抗菌性物質を産生するラクトバチルス属乳酸菌を含むことを特徴とするラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項７】 抗菌性物質が酵母の増殖を抑制する請求項６に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項８】 抗菌性物質が耐熱性の非有機酸物質である請求項６又は７に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項９】 ラクトバチルス属乳酸菌が、ラクトバチルス・サンフランシスコエンス（*Lactobacillus sanfranciscensis*）を含む請求項６から８のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項１０】 ラクトバチルス属乳酸菌の生菌を含む請求項６から９のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項１１】 食品に添加される請求項６から１０のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項１２】 食品に添加されるラクトバチルス属乳酸菌の生菌数が  $1.0 \times 10^8$  CFU/g 以上である請求項１１に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項１３】 食品がパン原料である請求項１１又は１２に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

## 【発明の詳細な説明】

## 【０００１】

【発明の属する技術分野】 本発明は、防黴性等を示す抗菌性物質を産生する新規な乳酸菌の菌株であるラクトバチルス・サンフランシスコエンス（*Lactobacillus sanfranciscensis*）、及び、食品等に好適に添加され酸臭等の発生を抑制可能な、ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液に関する。

## 【０００２】

【従来の技術】 従来から、各種の微生物が産生する抗菌性物質について研究がなされてきている。これらの抗菌性物質を食品等の分野に利用する場合には、無害でありかつ食品等の風味への影響が少ないことが必要とされることから、現実利用できる抗菌性物質及び該抗菌性物質を産生する微生物は限られたものになってしまう。

【０００３】 各種の微生物の中でも乳酸菌は、従来から、ヨーグルト等を始めとする乳製品等の食品中に含まれあるいは添加されていることから、該乳酸菌が産生する抗菌性物質については、安全性、食品の風味への影響が少ない等の点で期待されている。該乳酸菌が産生する抗菌性物質としては、乳酸等の有機酸、過酸化水素、ジアセチル等の低分子化合物などが既に知られており、更に、ヨーグルトスターター、チーズスターターとして利用されているラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis*）が産生するナisin（Nisin）、ラクトコッカス・クレモリス（*Lactococcus cremoris*）が産生するディプロコッキン（diplococcin）などのタンパクも知られている。

【０００４】 しかし、これらの抗菌性物質の場合、バクテリアの増殖を抑制するものの、徴や酵母等の増殖を抑制することができないという問題がある。徴は、殆ど全ての食品に対する腐敗菌となり、食品にとって大敵であり、食品分野においては可能な限りその増殖を抑制することが必要とされる。徴の増殖を抑制し得る抗菌性物質を産生する乳酸菌については、まだまだ報告が少なく、該抗菌性物質としてフェニル乳酸等の有機酸を産生するラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）が知られている程度である（Paola Lavermicocca et al. Applied and Environmental Microbiology, Sept. 2000, p4084~p4090, vol.66, No9など）。フェニル乳酸等の有機酸の防黴性は、必ずしも十分なレベルとは言えず、徴等の増殖を効果的に抑制することができ、安全であり、かつ食品の風味への影響が少ない抗菌性物質及び該抗菌性物質を産生する新規な乳酸菌の探索乃至開発が強く望まれている。

## 【０００５】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、このような要望に応え、従来における前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、徴の増殖を抑制する（防黴性を示す）抗菌性物質を産生する新規なラクトバチルス・サンフランシスコエンス（*Lactobacillus sanfranciscensis*）、及び、パン生地等の食品に好適に使用することができ、該食品の風味を害さず刺激的な酸臭・酸味等を抑制乃至マスクすることができ、防黴性等の抗菌性を示すラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液を提供することを目的とする。

## 【０００６】

【課題を解決するための手段】 前記課題を解決するため

(3) 002-291466 (P2002-291466A)

の手段は、以下の通りである。即ち、

<1> 菌の増殖を抑制する抗菌性物質を産生することを特徴とするラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) である。

<2> 抗菌性物質が酵母の増殖を抑制する前記<1>に記載のラクトバチルス・サンフランシスエンシスである。

<3> 抗菌性物質が耐熱性の非有機酸物質である前記<1>又は<2>に記載のラクトバチルス・サンフランシスエンシスである。

<4> オレイン酸栄養要求性があり、酸生成菌であり、マルトース発酵性を示す前記<1>から<3>のいずれかに記載のラクトバチルス・サンフランシスエンシスである。

<5> ヘテロ発酵型であり、酢酸に対する乳酸の産生量が重量比で10倍以上である前記<1>から<4>のいずれかに記載のラクトバチルス・サンフランシスエンシスである。

<6> 菌の増殖を抑制する抗菌性物質を産生するラクトバチルス属乳酸菌を含むことを特徴とするラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<7> 抗菌性物質が酵母の増殖を抑制する前記<6>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<8> 抗菌性物質が耐熱性の非有機酸物質である前記<6>又は<7>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<9> ラクトバチルス属乳酸菌が、ラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) を含む前記<6>から<8>のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<10> ラクトバチルス属乳酸菌の生菌を含む前記<6>から<9>のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<11> 食品に添加される前記<6>から<10>のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<12> 食品に添加されるラクトバチルス属乳酸菌の生菌数が  $1.0 \times 10^8$  CFU/g 以上である前記<11>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<13> 食品がパン原料である前記<11>又は<12>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】(ラクトバチルス・サンフランシスエンシス) 本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) は、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託済である。その受託番号は、FERM P-18244、FERM P-18245及びFERM P-18246で

ある。

【0008】本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) は、以下の抗菌性物質を産生可能であり、ラクトバチルス・サンフランシスエンシスの新菌株である。

【0009】前記抗菌性物質は、菌の増殖を抑制することができる(防菌性を示し)、酵母の増殖も抑制することができる。乳酸菌が産生する抗菌性物質として、バクテリアに対し増殖抑制能を示すバクテリオシンが知られているが、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスが産生する抗菌性物質は、バクテリアではなく菌や酵母に対し増殖抑制能を示すので、特に菌が問題となる食品分野等において有効である。

【0010】前記抗菌性物質は、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスが培養液中に分泌することにより産生される。このため、該抗菌性物質は、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスの培養液(発酵液)を遠心分離、ろ過等することにより、容易にラクトバチルス・サンフランシスエンシスの菌体と分離した状態で得ることができる。

【0011】前記抗菌性物質は、有機酸ではない。ラクトバチルス・プランタラムが産生する、菌の増殖を抑制する上記フェニル乳酸は有機酸であるので、該抗菌性物質はラクトバチルス・プランタラムが産生するフェニル乳酸等の抗菌性物質とは異なり、該フェニル乳酸等に比し抗菌活性が高い。

【0012】前記抗菌性物質は、耐熱性物質であり(非有機酸物質)、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスの培養液をオートクレーブ等しても抗菌性を失うことがない。このため、該抗菌性物質を利用する場合、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスの培養液(発酵液)をオートクレーブで滅菌処理することができる。

【0013】本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスは、グラム陽性無芽胞桿菌であり、嫌気性又は通性嫌気性であるラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) に属する。各種乳酸菌から該ラクトバチルス属を分離する方法としては、公知の方法に従って行うことができる。

【0014】本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスは、オレイン酸栄養要求性があり、通常のラクトバチルス属乳酸菌とは異なり、穀物に生息可能であり(このような乳酸菌を「植物性乳酸菌」と称することがある)、ライサワ一種より分離されたものである。このため、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスを他のラクトバチルス属乳酸菌から分離する際には、オレイン酸栄養要求性の有無を指標にすることができる。

【0015】本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスは、酸生成菌であり、炭酸カルシウムを溶解可

(4) 002-291466 (P2002-291466A)

能であるので、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスを他のラクトバチルス属乳酸菌から分離する際には、炭酸カルシウム溶解性の有無を指標にすることができる。

【0016】本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスは、マルトース発酵性（マルトースを炭素源として利用可能な性質）を示すので、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスを他のラクトバチルス属乳酸菌から分離する際には、マルトース発酵性の有無を指標にすることができる。

【0017】また、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスは、一般の乳酸菌と異なり、ラクトース発酵性（ラクトースを炭素源として利用可能な性質）を示さないため、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスを他のラクトバチルス属乳酸菌から分離する際には、ラクトース発酵性の有無を指標にすることができる。

【0018】本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスは、ヘテロ発酵型であり、酢酸に対する乳酸の産生量が重量比で10倍以上である。ヘテロ発酵型であるラクトバチルス・ブレビス（*Lactobacillus brevis*）等の場合、一般に酢酸に対する乳酸の産生量は重量比で約1倍であるので、他のヘテロ発酵型のものよりも酢酸の産生量が少ない。このため、本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスを他のヘテロ発酵型のものから分離する際には、産生した酢酸量と乳酸量との重量比を指標にすることができる。

【0019】本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスを実施する場合、前記産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託済であるので、これを実施する場合には分譲を受けてもよいし、上述した特長を指標にしてラクトバチルス属乳酸菌の中から分離してもよい。後者の場合、該分離は、例えば、前記オレイン酸栄養要求性の有無、前記炭酸カルシウムの溶解性の有無、前記マルトース発酵性の有無等によりスクリーニングしたラクトバチルス属乳酸菌を、酵母の自己消化液（フレッシュ・イーストエキストラクト）のオートクレープ後の上清を用いて増殖させ、前記抗菌性物質の産生の有無を調べることにより行うことができる。

【0020】（ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液）本発明のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液は、ラクトバチルス属乳酸菌を少なくとも含んでなり、必要に応じてその他の成分を含んでいてもよい。

【0021】前記ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液におけるラクトバチルス属乳酸菌の含有量としては、該発酵風味液中に前記抗菌性物質がその作用を示すのに十分な量含まれていればよく、用途等に応じて適宜決定することができる。特に制限はない。

【0022】前記その他の成分としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例え

ば、前記ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液を食品に添加する場合には、公知の食品添加物、調味料、着色料、保存料などが挙げられる。

【0023】前記ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液は、前記ラクトバチルス属乳酸菌を含み、該ラクトバチルス属乳酸菌により産生された抗菌性物質を含有している。そして、該抗菌性物質は、微の増殖を抑制することができる（防黴性を示す）ことが少なくとも必要であり、更に酵母の増殖を抑制することができることが好ましい（該抗菌性物質が微及び酵母の増殖抑制能を有する場合、該増殖抑制能を「抗真菌性」と、該抗菌性物質を「抗真菌性物質」と、それぞれ称することがある）。

【0024】前記ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液においては、前記抗菌性物質が前記ラクトバチルス属乳酸菌により分泌されることから、該ラクトバチルス属乳酸菌を細胞破碎等することなく、該ラクトバチルス属乳酸菌の培養液をそのまま使用することができる。このため、前記ラクトバチルス属乳酸菌による発酵風味液は、その調製が極めて容易である。なお、本発明のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液には、前記ラクトバチルス属乳酸菌を含むもののみならず、該ラクトバチルス属乳酸菌を遠心分離、ろ過等を行うことにより分離して得た上清も含まれるものとする。

【0025】前記ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液は、該ラクトバチルス属乳酸菌として、少なくとも前記本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシス（*Lactobacillus sanfranciscensis*）を含み、本発明の効果を害しない範囲内において更に他の菌を含んでいてもよいが、全菌が前記本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシス（*Lactobacillus sanfranciscensis*）であるのが好ましい。

【0026】前記抗菌性物質は耐熱性であり、オートクレープを行ってもその抗菌性が失われないので、前記ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液は、オートクレープ処理等の滅菌処理が可能であり、保存等の点で有利である。なお、前記抗菌性物質は非有機酸物質であるので、該ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液を分析すると、フェニル乳酸、カプロン酸等の既知の抗菌性のある有機酸が検知されない。

【0027】本発明のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液は、ラクトバチルス属乳酸菌の生菌を含んでいるので、食品等に添加すると、該食品中で該ラクトバチルス属乳酸菌が発酵し、前記抗菌性物質を更に産生し、また、ヘテロ発酵により有機酸を産生してpH低下を生じさせることができ、前記防黴性等の抗菌性をより強く発現させることが可能となり得る点で有利である。しかも、前記ラクトバチルス属乳酸菌が前記本発明のラクトバチルス・サンフランシスエンシスである場合には、前記ヘテロ発酵により産生される有機酸における酢酸の占める割合が少ないので、酢酸特有の酸臭が生ずることが

(5) 002-291466 (P2002-291466A)

ないので、風味を損なうことがなく、食品等に好適に添加することができる点で有利である。

【0028】本発明のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液は、各種分野において好適に使用することができるが、例えば食品に添加されるのが好ましい。前記食品としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、パン類、菓子類、ジュース類、糖類、酒類など穀物を原料とした食品が好適であり、これらの中でも、日保延長効果が得られ、小麦粉由来の粉臭・油脂の酸化臭のマスクング効果が得られ、酸味臭を付与することなく、食感をソフトにすることができる等の点で、パンが特に好ましい。

【0029】本発明のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液を該食品に添加する場合、該食品に添加されるラクトバチルス属乳酸菌の生菌数としては、本発明の効果が得られる範囲内であれば特に制限はなく、該食品の種類、目的等に応じて適宜選択することができる。該食品がパンである場合には、該ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液として $1.0 \times 10^8$  CFU/g以上であれば、通常、十分な抗菌効果が得られる。前記食品がパンである場合、前記ラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液は、パン原料に添加されるのが好ましく、抗菌効果の点でパンの製造におけるミキシング工程でパン原料に添加されるのがより好ましい。なお、パンの製法としては、特に制限はなく、中種製パン法、直捏法（ストレート法）、液種法などが挙げられるが、パン生地中で前記ラクトバチルス属乳酸菌が発酵し得る観点からは、中種法が好ましい。

【0030】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【0031】（実施例1及び比較例1）本発明のラクトバチルス・サンフランシスコエンシス（*Lactobacillus sanfranciscensis* FERM P-18244～6）を以下のようにして乳酸菌から分離した。即ち、まず乳酸菌試料を希釈した。これをGYYP白亜寒天培地及びMYYP白亜寒天培地に接種し、 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ で3～7日間培養した。その後、ハローを形成した酸生成菌のコロニーを選択し、釣菌し、これを保存培地に接種し培養した。その後、菌株の簡易同定として、菌の形状観察、オレイン酸栄養要求性試験、ラクトース発酵試験及びマルトース

発酵試験を行い、桿菌であり、オレイン酸栄養要求性があり、ラクトース発酵性を示さず、かつマルトース発光性を示す菌株を選択・分離し、この分離乳酸菌を、 $30^\circ\text{C}$ で下記組成の乳酸菌培養用の液体培地に、 $1.0 \times 10^6$  CFU/ml接種して $30^\circ\text{C}$ で48時間静置培養した。

【0032】

<乳酸菌培養用の液体培地（改変sourdough培地）>

・マルトース・・・・・・・・・・2.0%  
・イースト・エキストラクト・・・・・・・・1.0%  
・ツイーン80・・・・・・・・・・0.03%  
・トリプチカーゼ・ペプトン（BBL）・・0.5%  
pH=6.5（NaOH）、 $121^\circ\text{C}$ ・15分間・オートクレーブ滅菌

【0033】次に、試験区（実施例）と対照区（対照実験）とを以下のようにして行った。即ち、前記対照区（対照実験）は、上記培養の上清と、新鮮なYPD培地（イーストエキストラクト1.0%、ポリペプトン2.0%及びグルコース2.0%）とを1：1の割合で混合した混合培地をのみを使用した。前記試験区（実施例及び比較例）は、前記混合培地に、酵母菌株（*Saccharomyces cerevisiae*）を接種し、 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ で静置培養し、48時間後及び72時間後3日間培養し、該培養液のOD660nmでの吸光度を測定し、該酵母菌株の増殖性を評価した。

【0034】その結果、前記対照区（対照実験）の場合、前記混合培地の混合直後のOD660nmは0.04であり、48時間後のOD660nmは9.4であり、72時間後のOD660nmは9.6であった。一方、前記試験区（実施例）の場合、前記酵母菌株を接種直後の該混合培地のOD660nmは0.05であり、接種48時間後の該混合培地のOD660nmは1.5であり、接種72時間後の該混合培地のOD660nmは5.8であった。該試験区（実施例）で用いた前記分離乳酸菌は、ラクトバチルス・サンフランシスコエンシス（*Lactobacillus sanfranciscensis* FERM P-18244～6）である。これらの結果を表1に示した。次に、前記分離乳酸菌を表1に示すものに代えた以外は上記同様にした。その結果を表1に示した。

【0035】

【表1】

乳酸菌上清調製時の乳酸菌	吸光度 (OD660nm)					
	接種直後		48時間後		72時間後	
	対照区	試験区	対照区	試験区	対照区	試験区
<i>Lb. sanfranciscensis</i> SDB-5	0.04	0.05	9.4	1.5	9.6	5.8
<i>Lb. sanfranciscensis</i> SDB-2	0.05	0.05	9.5	3.8	9.8	8.2
<i>Lb. sanfranciscensis</i> ATCC27651	0.05	0.04	9.6	8.5	9.7	10.6
<i>Lb. brevis</i> ATCC4006	0.04	0.04	9.3	6.9	9.4	10.1
<i>Lb. plantum</i> It-03074	0.05	0.05	9.5	9.1	9.5	11.2

【0036】表1に示す結果から、本発明のラクトバチルス・サンフランシスコエンシス（*Lactobacillus sanfra*

*nciscensis* FERM P-18244～6）を用いた培養液（発酵液）は、酵母の増殖抑制能があることが明らか

(6) 002-291466 (P2002-291466A)

である。

【0037】前記酵母菌株として、酵母菌株 (*Saccharomyces cerevisiae*) に代えて、*Candida albicans*、*Pichia farinose*、*Debaryomyces hansenii*、をそれぞれ用いて同様の試験を行った結果、*Saccharomyces cerevisiae*の場合と同様の結果が得られた。

【0038】(実施例2及び比較例2) 本発明のラクトバチルス・サンフランシスコエンス (*Lactobacillus sanfranciscensis* FERM P-18246) を実施例1と同様の方法で分離し、上記乳酸菌培養用の液体培地に、 $1.0 \times 10^6$  CFU/ml 接種して30℃で48時間静置培養し、 $1.0 \times 10^{10}$  CFU/g の菌液を調製した。

【0039】次に、下記組成のオーバーナイト中種製パン法用中種を調製した。ミキシング条件は、低速2分・中速1.5分 (L2M1.5) であり、22℃で捏上した後、22℃、85RH%で14～16時間発酵させた。

<オーバーナイト中種製パン法用中種>

・小麦粉 (強力粉) . . . . .	70重量%
・イースト . . . . .	2.2重量%
・製パン改良剤 . . . . .	0.1重量%
・上記菌液 . . . . .	1重量%
・水 . . . . .	40重量%

【0040】前記オーバーナイト中種製パン法用中種を用い、下記条件にて本捏を行った後、仕上げ (分割重量: 200g/6個 (プルマン)、ベンチタイム: 20分、ワンローフ型に成型後、U字型に折って型詰めした)、ホイロ発酵 (35℃、80RH%、50～55分)、焼成 (210℃、35分) を行い、食パンを製造した。なお、本捏のミキシング条件は、低速1分・中速3分 (L1M3) であり、27℃で捏上した (フロアタイム: 20分)。

<本捏>

・小麦粉 (強力粉) . . . . .	30重量%
・食塩 . . . . .	2重量%
・砂糖 . . . . .	6重量%
・脱脂粉乳 . . . . .	2重量%
・ショートニング . . . . .	5重量%
・水 . . . . .	25重量%

【0041】得られた食パンに、黴 (使用菌株: *Aspergillus niger*、*Penicillium chrysogenum*、*Aspergillus oryzae* var. *brunneus*、*Rhizopus oryzae*、*Penicillium citrium*、*Penicillium funiculosum*、*Mucor hiemalis* f. *hiemalis*) の強制汚染試験 (条件: 焼き上がったパンをスライスし、9ヶ所約10胞子ずつ植菌した) を行った

ところ、上記菌液を使用しなかった比較例2では、汚染約4日後に黴のコロニーが出現したのに対し、該菌液を使用した実施例2では、汚染約6日後に黴のコロニーが出現し、約2日間黴に汚染される時期が延長された。これらの結果を表2に示した。

【0042】次に、下記組成の4時間中種製パン法用中種を調製した。ミキシング条件は、低速2分・中速1.5分 (L2M1.5) であり、24℃で捏上した後、24℃、80RH%で4時間発酵させた。

<4時間中種製パン法用中種>

・小麦粉 (強力粉) . . . . .	70重量%
・イースト . . . . .	2.2重量%
・製パン改良剤 . . . . .	0.1重量%
・上記菌液 . . . . .	1重量%
・水 . . . . .	40重量%

【0043】前記4時間中種製パン法用中種を用い、下記条件にて本捏を行った後、仕上げ (分割重量: 220g/6個 (プルマン)、ベンチタイム: 20分、ワンローフ型に成型後、U字型に折って型詰めした)、ホイロ発酵 (35℃、80RH%、50～55分)、焼成 (210℃、35分) を行い、食パンを製造した。なお、本捏のミキシング条件は、低速1分・中速3分・ショートニング添加後・中速3分・高速1分 (L1M3↓M3H1) であり、27℃で捏上した (フロアタイム: 20分)。

<本捏>

・小麦粉 (強力粉) . . . . .	30重量%
・食塩 . . . . .	2重量%
・砂糖 . . . . .	6重量%
・脱脂粉乳 . . . . .	2重量%
・ショートニング . . . . .	5重量%
・水 . . . . .	27重量%

【0044】得られた食パンに、黴 (使用菌株: *Aspergillus niger*、*Penicillium chrysogenum*、*Aspergillus oryzae* var. *brunneus*、*Rhizopus oryzae*、*Penicillium citrium*、*Penicillium funiculosum*、*Mucor hiemalis* f. *hiemalis*) の強制汚染試験 (条件: 焼き上がったパンをスライスし、9ヶ所約10胞子ずつ植菌した) を行ったところ、上記菌液を使用しなかった比較例2では、汚染約4日後に黴のコロニーが出現したのに対し、該菌液を使用した実施例2では、汚染約5日後に黴のコロニーが出現し、約1日間黴に汚染される時期が延長された。これらの結果を表2に示した。

【0045】

【表2】

(7) 002-291466 (P2002-291466A)

パン保管 (28℃)	中種製パン (食パン)		オーバーナイト (食パン)	
	無添加	乳酸菌液添加	無添加	乳酸菌液添加
1日	—	—	—	—
2日	—	—	—	—
3日	—	—	—	—
4日	+	—	±	—
5日	++	±	+	—
6日	+++	+	++	±

【0046】なお、表2において、「—」は、微のコロニーが全く観られない状態を意味し、「±」は、微のコロニーがかすかに観られる状態を意味し、「+」は、微の小さなコロニーが観られる状態を意味し、「++」は、微のコロニーが点在している状態を意味し、「+++」は、微のコロニーが広がっている状態を意味する。

【0047】

【発明の効果】本発明によると、従来における前記諸問

題を解決することができ、微の増殖を抑制する（防微性を示す）抗菌性物質を産生する新規なラクトバチルス・サンフランシスコエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*)、及び、パン生地等の食品に好適に使用することができ、該食品の風味を害さず刺激的な酸臭・酸味等を抑制乃至マスクすることができ、防微性等の抗菌性を示すラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液を提供することができる。

【手続補正書】

【提出日】平成13年7月11日（2001. 7. 11）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 微及び酵母の増殖を抑制する耐熱性の非有機酸物質である抗菌性物質を産生することを特徴とするラクトバチルス・サンフランシスコエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*)。

【請求項2】 オレイン酸栄養要求性があり、酸生成菌であり、マルトース発酵性を示す請求項1に記載のラクトバチルス・サンフランシスコエンシス。

【請求項3】 ヘテロ発酵型であり、酢酸に対する乳酸の産生量が重量比で10倍以上である請求項1又は2に記載のラクトバチルス・サンフランシスコエンシス。

【請求項4】 微及び酵母の増殖を抑制する耐熱性の非有機酸物質である抗菌性物質を産生するラクトバチルス属乳酸菌を含むことを特徴とするラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項5】 ラクトバチルス属乳酸菌が、ラクトバチルス・サンフランシスコエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) を含む請求項4に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項6】 ラクトバチルス属乳酸菌の生菌を含む請求項4又は5に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項7】 食品に添加される請求項4から6のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項8】 食品に添加されるラクトバチルス属乳酸菌の生菌数が  $1.0 \times 10^8$  CFU/g以上である請求項7に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項9】 食品がパン原料である請求項7又は8に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項10】 請求項4から9のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液を用いてパンを製造することを特徴とする製パン方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決するための手段は、以下の通りである。即ち、

<1> 微及び酵母の増殖を抑制する耐熱性の非有機酸物質である抗菌性物質を産生することを特徴とするラクトバチルス・サンフランシスコエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) である。

<2> オレイン酸栄養要求性があり、酸生成菌であり、マルトース発酵性を示す前記<1>に記載のラクトバチルス・サンフランシスコエンシスである。

<3> ヘテロ発酵型であり、酢酸に対する乳酸の産生量が重量比で10倍以上である前記<1>又は<2>に記載のラクトバチルス・サンフランシスコエンシスである。

<4> 微及び酵母の増殖を抑制する耐熱性の非有機酸物質である抗菌性物質を産生するラクトバチルス属乳酸菌を含むことを特徴とするラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。



(8) 002-291466 (P2002-291466A)

<5> ラクトバチルス属乳酸菌が、ラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) を含む前記<4>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<6> ラクトバチルス属乳酸菌の生菌を含む前記<4>又は<5>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<7> 食品に添加される前記<4>から<6>のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液であ

る。

<8> 食品に添加されるラクトバチルス属乳酸菌の生菌数が  $1.0 \times 10^8$  CFU/g 以上である前記<7>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<9> 食品がパン原料である前記<7>又は<8>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<10> 前記<4>から<9>のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液を用いてパンを製造することを特徴とする製パン方法である。

#### 【手続補正書】

【提出日】平成13年8月28日(2001.8.28)

#### 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 徴及び酵母の増殖を抑制する耐熱性の非有機酸物質である抗菌性物質を産生することを特徴とするラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*)。

【請求項2】 オレイン酸栄養要求性があり、酸生成菌であり、マルトース発酵性を示す請求項1に記載のラクトバチルス・サンフランシスエンシス。

【請求項3】 ヘテロ発酵型であり、酢酸に対する乳酸の産生量が重量比で10倍以上である請求項1又は2に記載のラクトバチルス・サンフランシスエンシス。

【請求項4】 徴及び酵母の増殖を抑制する耐熱性の非有機酸物質である抗菌性物質を産生するラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) を含むことを特徴とするラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項5】 ラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) の生菌を含む請求項4に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項6】 食品に添加される請求項4又は5に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項7】 食品に添加されるラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) の生菌数が  $1.0 \times 10^8$  CFU/g 以上である請求項6に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項8】 食品がパン原料である請求項6又は7に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液。

【請求項9】 請求項4から8のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液を用いてパンを製造することを特徴とする製パン方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決するための手段は、以下の通りである。即ち、

<1> 徴及び酵母の増殖を抑制する耐熱性の非有機酸物質である抗菌性物質を産生することを特徴とするラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) である。

<2> オレイン酸栄養要求性があり、酸生成菌であり、マルトース発酵性を示す前記<1>に記載のラクトバチルス・サンフランシスエンシスである。

<3> ヘテロ発酵型であり、酢酸に対する乳酸の産生量が重量比で10倍以上である前記<1>又は<2>に記載のラクトバチルス・サンフランシスエンシスである。

<4> 徴及び酵母の増殖を抑制する耐熱性の非有機酸物質である抗菌性物質を産生するラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) を含むことを特徴とするラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<5> ラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) の生菌を含む前記<4>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<6> 食品に添加される前記<4>又は<5>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<7> 食品に添加されるラクトバチルス・サンフランシスエンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) の生菌数が  $1.0 \times 10^8$  CFU/g 以上である前記<6>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<8> 食品がパン原料である前記<6>又は<7>に記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液である。

<9> 前記<4>から<8>のいずれかに記載のラクトバチルス属乳酸菌の発酵風味液を用いてパンを製造することを特徴とする製パン方法である。

!(9) 002-291466 (P2002-291466A)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
C 1 2 R 1:225)			

(72)発明者 中村 奈津子	F ターム(参考)	4B021 MC01 MK06 MP01
東京都板橋区小豆沢 3 丁目 6 番10号 オリ		4B032 DB01 DK53 DK70
エンタル酵母工業株式会社内		4B065 AA30X AC14 AC20 BA22
		CA34 CA41